

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. November 2003 (27.11.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/098182 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N (74) Anwalt: PATENTANWÄLTE RUFF, WILHELM, BEIER, DAUSTER & PARTNER; Kronenstrasse 30, 70174 Stuttgart (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/05091 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum:
15. Mai 2003 (15.05.2003) (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
102 24 803.6 15. Mai 2002 (15.05.2002) DE
102 36 716.7 6. August 2002 (06.08.2002) DE
103 15 932.0 2. April 2003 (02.04.2003) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): PROTEOSYS AG [DE/DE]; Carl-Zeiss-Strasse 51, 55129 Mainz (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): STEGMANN, Werner [DE/DE]; Flörsheimer Strasse 38, 65439 Flörsheim (DE). CAHILL, Michael [AU/DE]; Weinbergstrasse 34, 55296 Lörzweiler (DE). SCHRATTENHOLZ, André [DE/DE]; Hinter der Kirche 43, 55129 Mainz (DE).
- Veröffentlicht:
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR QUANTIFYING MOLECULES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR QUANTIFIZIERUNG VON MOLEKÜLEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for determining the ratio of the protein frequencies of proteins of the same type in a first and at least one second sample, to a method for determining the concentration of stable isotopes in molecules and to a method for determining the incorporation rate of labelled substances into proteins.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung des Verhältnisses der Proteinhäufigkeiten gleichartiger Proteine in einer ersten und einer mindestens zweiten Probe ein Verfahren zur Bestimmung der Anreicherung von stabilen Isotopen in Molekülen und ein Verfahren zur Bestimmung der Einbaurate von markierten Substanzen in Proteine.

WO 03/098182 A2

Beschreibung

Verfahren zur Quantifizierung von Molekülen

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Anreicherung von stabilen Isotopen in Molekülen, ein Verfahren zur Bestimmung des Verhältnisses der Proteinhäufigkeiten gleichartiger
10 Proteine in einer ersten und einer mindestens zweiten Probe, ein Verfahren zur Bestimmung der Einbaurate von markierten Substanzen in Proteine und ein Verfahren zur Gewinnung von Informationen über Proteine und/oder Peptide. Die Proben bestehen insbesondere aus Zellen, Zellsystemen, Organismen oder Teilen davon.

15

In der Proteinanalytik hat die Verwendung von Massenspektrometern im vergangenen Jahrzehnt einen großen Aufschwung erlebt. Dies hängt mit der Entwicklung spezieller massenspektrometrischer Methoden zusammen, mit denen die Massen großer Biomoleküle, beispielsweise
20 Proteine oder Peptide, mit hoher Präzision bestimmt werden können. Aufgrund solcher Massenbestimmungen und Informationen aus Gen- und Proteindatenbanken können Proteine heute im Hochdurchsatz identifiziert werden.

25 Die angewandten massenspektrometrischen Methoden sind MALDI-TOF-Massenspektrometrie und ESI-Massenspektrometrie. Dabei sind MALDI (Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation) und ESI (Electro-Spray-Ionisation) Ionisierungsmethoden, mit denen Biomoleküle "schonend", d. h. zerstörungsfrei, ionisiert werden können. Zum
30 Massennachweis der ionisierten Biomoleküle werden Massenanalysatoren benutzt, die Ionen entsprechend ihres Masse zu Ladung Verhältnisses m/z untersuchen können. Als

- 2 -

Massenanalysatoren sind Flugzeit (TOF = Time Of Flight) MS, Quadrupol MS, Ionenfallen MS und FTICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonanz) MS (MS = Massenspektrometrie) im Gebrauch.

- 5 Massenpektren von Biomolekülen zeigen eine Massenverteilung, die aufgrund der unterschiedlichen Massen der natürlich vorkommenden Isotope der Elemente entstehen, aus denen die Biomoleküle aufgebaut sind. Mit Massenspektrometern, die eine genügend große Massenauflösung besitzen, können die Massenverteilungen von
- 10 Biomolekülen in einzelne Massenpeaks aufgelöst werden. Solche Massenpeaks bzw. ihre Verteilungen werden im folgenden als Isotopomere bzw. Isotopomerenverteilungen bezeichnet. Da in diesem Bereich keine einheitliche Nomenklatur besteht, ist im folgenden unter Isotopomer auch Isotopolog oder vergleichbare Ausdrücke zu verstehen.
- 15 Der Begriff Isotopomerenverteilung ist auch mit dem Begriff Isotopenmuster gleichzusetzen.

Beispiele für die Verwendung von Massenspektrometrie in der Proteinanalytik, hier in Verbindung mit der Markierung von Analysaten

20 mit stabilen Isotopen, sind die in [Chen 2000], [Veenstra 2000], [Ong 2002] und [Pratt 2002] beschriebenen Verfahren, welche die Bestimmbarkeit von Proteinen bzw. Peptiden durch Massen-Fingerprints verbessern bzw. erleichtern.

- 25 Bei dem in [Chen 2000] beschriebenen Verfahren wird zweifach deuteriertes Glycin oder dreifach deuteriertes Methionin zu qualitativen Zwecken in Proteine von Bakterien eingebaut, um dadurch die Bestimmbarkeit von Proteinen bzw. Peptiden durch Massen-Fingerprints zu verbessern. Aufgrund der geringen Massendifferenzen zwischen
- 30 markierten und nicht markierten Aminosäuren und den daraus resultierenden Überlappungen ihrer Isotopomerenverteilungen ist dieses

Verfahren nur für Peptide mit einer Masse von kleiner als 2000 Da anwendbar.

Bei den in [Veenstra 2000] und [Pratt 2002] beschriebenen Verfahren
5 wird mit stabilen Isotopen markiertes Leucin (Leu-d10) in Bakterien
eingebaut. In einer ähnlichen Vorgehensweise, bei dem in [Ong 2002]
beschriebenen Verfahren, wird mit stabilen Isotopen markiertes Leucin
(Leu-d3) in Säugetierzellkulturen eingebaut. Diese Studien sind so
angelegt, daß möglichst große Massendifferenzen zwischen markierten
10 und nicht markierten Proteinen bzw. Peptiden erzeugt werden, um
getrennte, nicht überlappende Isotopomerenverteilungen, die mit Hilfe
der MALDI-TOF-Massenspektrometrie bzw. ESI-Q-TOF-
Massenspektrometrie ermittelt werden, zu erhalten. Neben der
Voraussetzung weitestgehender Überlappungsfreiheit der
15 Isotopomerenverteilungen markierter bzw. nicht markierter Moleküle ist
eine weitere Voraussetzung bei diesen Verfahren, daß die markierte
Protein- bzw. Peptidfraktion möglichst vollständig in ihren
Markierungspositionen markiert ist, da nur dann quantitative Ergebnisse
erzielt werden können. Insbesondere ist hiernach ohne eine komplette
20 Inkorporation von Leu-d3 in den Proteinen eine genaue Quantifizierung
der markierten und unmarkierten Zellen nicht möglich.

Die oben erwähnten Verfahren sind daher nur zur Untersuchung von
Organismen oder Zellen geeignet, in denen Aminosäuren mit normaler
25 Isotopenzusammensetzung nahezu vollständig durch entsprechende,
mit stabilen Isotopen markierte Aminosäuren ausgetauscht werden
können. Dabei ist man im wesentlichen auf Zellen bzw. einzellige
Organismen beschränkt, die in mit stabilen Isotopen markierten
Kulturmedien gezüchtet werden können. Nicht verwendbar sind diese
30 konventionellen Methoden für die "*in vivo*" Markierung ganzer
Lebewesen, z. B. von Mäusen, da die erforderlichen hohen
Markierungsgrade dort nicht erreicht werden können.

- 4 -

Wünschenswert sind daher neue Verfahren zur Gewinnung weiterer molekülspezifischer Parameter, die eine weitere qualitative und/oder quantitative Analyse von Molekülen, insbesondere Proteinen und/oder
5 Peptiden, ermöglichen.

Aufgabe der Erfindung ist es, Verfahren zur qualitativen bzw. quantitativen Analyse von Molekülen bereitzustellen, die schnell, selektiv und kostengünstig durchgeführt werden können.

10

Diese Aufgabe wird gelöst durch den Gegenstand der unabhängigen Ansprüche. Bevorzugte Ausführungsformen sind in den abhängigen Ansprüchen genannt. Der Wortlaut sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt der Beschreibung gemacht.

15

Überraschenderweise wurde gefunden, daß durch die Auswertung der Isotopomerenverteilung von Molekülen diesbezügliche Aussagen getroffen werden können.

20 Erfindungsgemäß wird bei einem Verfahren zur Bestimmung der Anreicherung von stabilen Isotopen in Molekülen, insbesondere in Proteinen und/oder Peptiden, die Isotopomerenverteilung der Moleküle durch Massenspektrometrie ermittelt und die Anreicherung der stabilen Isotope durch Vergleich der ermittelten Isotopomerenverteilung mit einer
25 Referenzverteilung der Moleküle berechnet.

In einer Weiterbildung der Erfindung ist die Referenzverteilung die theoretische, insbesondere natürlich vorkommende, Isotopomerenverteilung der Moleküle. Jede Abweichung von der
30 natürlich vorkommenden Isotopomerenverteilung kann auf die Anreicherung der Moleküle mit stabilen Isotopen zurückgeführt werden. Die Anreicherung kann durch Markierung der Moleküle mit stabilen

Isotopen erfolgen und/oder beispielsweise durch Mischung von zwei Proben, wobei eine Probe eine natürliche oder sonst bekannte Isotopomerenverteilung aufweist und die andere Probe mit einem oder mehreren stabilen Isotopen markiert ist. Im Fall einer Mischung
5 verschiedener Proben kann das Verhältnis der Proteinhäufigkeiten gleichartiger Proteine in den jeweiligen Proben bestimmt werden, vorausgesetzt, daß die Isotopomerenverteilungen der Moleküle mit den entsprechenden stabilen Isotopen in allen Proben und alle Verbindungen bekannt und homogen sind.

10

Die Isotopomerenverteilung hierzu kann beispielsweise durch ein Verfahren zur Bestimmung der Anreicherung von stabilen Isotopen in Proteinen, Peptiden und/oder deren Fragmenten ermittelt werden. Hierbei werden die Aminosäuren und/oder die Fragmente der Proteine
15 und/oder Peptide durch beispielsweise Hydrolyse und anschließende Chromatographie gewonnen. Die Isotopenzusammensetzung der Aminosäuren und/oder der Fragmente und/oder Atome wird bestimmt, und aus den bestimmten Isotopenzusammensetzungen können die Isotopomerenverteilungen ermittelt werden. Für die Bestimmung der
20 Isotopenzusammensetzungen ist insbesondere die ICP-(inductively coupled plasma)-MS geeignet.

Bei Verwendung dieses Verfahrens muß vorteilhafterweise nur eine Massenspektrometrie einer Mischung von beispielsweise zwei
25 unterschiedlichen Proben durchgeführt werden, um das Verhältnis der Proteinhäufigkeiten gleichartiger Proteine dieser Proben bestimmen zu können.

In einer Weiterbildung der Erfindung ist die Molekülzusammensetzung
30 bekannt bzw. wird die Molekülzusammensetzung auf Basis des Massen-Fingerprints der Moleküle ermittelt und die theoretische Isotopomerenverteilung der Moleküle rechnerisch anhand der

Molekülzusammensetzung und/oder mit Hilfe z. B. einer Datenbank bestimmt.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Referenzverteilung aus nicht angereicherten Molekülen und/oder angereicherten Molekülen mit bekannter Anreicherung bestimmt.

Weiterhin umfaßt die Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung der unterschiedlichen Anreicherung von stabilen Isotopen in Proteinen, 10 Peptiden und/oder deren Fragmenten von verschiedenen Proben, welches sich dadurch auszeichnet, daß die stabile Isotopenanreicherung des Pools von einem oder mehreren individuellen Aminosäuren-Bestandteilen in der Probe mit dem Protein und/oder Peptid experimentell bestimmt wird. Hierbei werden Aminosäuren und/oder 15 Fragmente der Proteine und/oder Peptide beispielsweise durch Hydrolyse und anschließende Chromatographie oder MS/MS oder ähnliches gewonnen und die Isotopenzusammensetzung der Aminosäuren und/oder der Fragmente bestimmt. Aus den bestimmten Isotopenzusammensetzungen kann die durchschnittliche 20 Anreicherungsrate von einem oder mehreren individuellen Aminosäurebestandteilen bestimmt werden. Diese Aminosäureanreicherung erlaubt eine massenspektrometrische Messung der markierten Probe ohne die theoretischen Isotopomer-Verteilungen von einer Vergleichsprobe zu errechnen.

25

Erfindungsgemäß umfaßt das Verfahren zur Bestimmung der Anreicherung von stabilen Isotopen in Proteinen in einer Probe folgende Schritte:

- Markieren der Proteine der Probe mit stabilen Isotopen,
- 30 - Separation der Proteine der Probe mit Hilfe eines Separationsmittels, insbesondere eines 2D-Gels, gegebenenfalls in mehreren Schritten,

- 7 -

- gegebenenfalls Gewinnung von Fragmenten aus den separierten Proteinen durch spezifisches Spalten oder Verdau der Proteine vor oder nach der Separation,
- Ermitteln der Isotopomerenverteilung der Fragmente durch
5 MALDI-TOF-Massenspektrometrie und
- Berechnung der Anreicherung von stabilen Isotopen aus der ermittelten Isotopomerenverteilung im Vergleich mit einer zu erwartenden Isotopomerenverteilung eines Referenzwertes, z. B. die natürlich vorkommende oder eine bekannte
10 Isotopomerenverteilung.

Die Erfindung umfaßt ferner ein Verfahren zur Bestimmung der Anreicherung von stabilen Isotopen in Proteinen, Peptiden und/oder deren Fragmenten, bei dem die Aminosäuren und/oder die Fragmente
15 der Proteine und/oder Peptide durch Hydrolyse und anschließende Chromatographie gewonnen, die Isotopenzusammensetzung der Aminosäuren und/oder der Fragmente bestimmt und aus den bestimmten Isotopenzusammensetzungen die Anreicherungsrate bestimmt wird. Für die Bestimmung der Isotopenzusammensetzungen
20 ist beispielsweise die ICP-(Inductively coupled Plasma)-MS geeignet.

Werden mehr als zwei Proben untersucht, kann beispielsweise eine Probe unmarkiert bleiben, eine zweite Probe mit beispielsweise ^{15}N und eine eventuelle dritte oder weitere Proben mit beispielsweise ^{13}C oder
25 gleichwertigen Isotopen markiert und die Proben anschließend gemischt werden. Wenn die Isotopenverteilung der Aminosäuren für alle Proben bekannt ist, kann eine Mischung von Proteinen aus allen Proben unter Berücksichtigung der Isotopomeren mehrerer Peptide eines Proteins, insbesondere durch mehrere Messungen unterschiedlich kombinierter
30 Mischungen der Proben, quantifiziert werden.

Den erfindungsgemäßen Verfahren ist gemeinsam, daß zu einer Analyse von Molekülen die Isotopomerenverteilung der Moleküle mit Hilfe einer hochauflösenden Massenspektrometrie, insbesondere der MALDI-TOF-Massenspektrometrie, ermittelt wird. Ausgehend von den
5 derart ermittelten Isotopomerenverteilung ist es möglich, verschiedene qualitative und/oder quantitative Aussagen über die Moleküle zu treffen. Die Isotopomerenverteilungen kommen durch die Existenz von schweren Isotopen der Elemente zustande, aus denen die Moleküle aufgebaut sind. Den größten Einfluß bei Isotopomerenverteilungen von
10 Peptiden haben hierbei die relativ häufigen schweren Isotope der Elemente Kohlenstoff ($^{13}\text{C} = 1,1 \%$) und Stickstoff ($^{15}\text{N} = 0,37 \%$).

Die mit der TOF-, insbesondere MALDI-TOF-, Massenspektrometrie erzielbare Massenauflösung liegt deutlich über der durch andere MS-
15 Techniken (ESI-Quadrupol- bzw. Ion-Trap-MS) erzielbaren Massenauflösung. Auch Verfahren mit vergleichbarer oder besserer Massenauflösung, wie der FTICR-MS, können angewandt werden.

Überraschenderweise konnte aufgezeigt werden, daß mit Hilfe der
20 MALDI-TOF-Massenspektrometrie die Isotopomerenverteilungen von Peptiden hochauflösend, innerhalb enger Fehlergrenzen reproduzierbar ermittelt werden können.

Die Reproduzierbarkeit solcher, mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie
25 gemessenen, Isotopomerenverteilungen wurde bislang nicht eingehend getestet. Zum qualitativen Vergleich wurden diese Verteilungen zwar oft herangezogen, dagegen wurden quantitative Aussagen nicht aus Einzelverteilungen bzw. Überlagerungen von Einzelverteilungen, sondern nur aus massenmäßig weit auseinanderliegenden, durch hohe
30 Isotopenanreicherungen der Moleküle gewonnene, Einzelverteilungen abgeleitet. Argumente gegen ihre quantitative Verwendung wurden mit

verfälschenden, nicht kalibrierbaren Einflüssen aus dem MALDI-Ionisationsprozeß und der TOF-Massenanalyse begründet.

Erfindungsgemäß umfaßt das Verfahren zur Bestimmung des
5 Verhältnisses der Proteinhäufigkeiten gleichartiger Proteine in einer ersten und einer mindestens zweiten Probe folgende Schritte:

- Markieren der Proteine mindestens einer Probe mit stabilen Isotopen,
- Herstellung einer Proteinmischung gleicher Proteinmengen aus
10 der ersten und der mindestens zweiten Probe,
- getrennte Separation der Proteine der ersten Probe, der Proteinmischung und der mindestens zweiten Probe mit Hilfe eines Separationsmittels, insbesondere eines 2D-Gels, gegebenenfalls in mehreren Schritten,
- 15 - gegebenenfalls Gewinnung von Fragmenten aus den separierten Proteinen durch spezifisches Spalten oder Verdau der Proteine, vor oder nach der Separation oder direkt nach der Markierung,
- Ermitteln der Isotopomerenverteilung der Fragmente durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie und
- 20 - Berechnung der Verhältnisse der Proteinhäufigkeiten zwischen der ersten und der mindestens zweiten Probe aus den ermittelten Isotopomerenverteilungen.

Die Häufigkeiten der gleichartigen, d. h. sich entsprechenden, Proteine
25 in der ersten bzw. in der mindestens zweiten Probe sind unbekannt. Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird das Verhältnis dieser Häufigkeiten bestimmt. Das Verfahren ist analog zur Bestimmung des Verhältnisses der Häufigkeiten sich entsprechender Peptide in der ersten bzw. in der mindestens zweiten Probe geeignet. Die gleichartigen
30 Proteine können isoliert vorhanden oder beispielsweise in Zellen lokalisiert sein. Sind die Proteine in Zellen lokalisiert, bestehen die beiden Proben typischerweise aus gleichartigen Zellkulturen,

sogenannten Zellpools. Durch das erfindungsgemäße Verfahren werden hierbei die relativen zellulären Proteinhäufigkeiten bestimmt bzw. quantifiziert.

5 Bei diesem Verfahren werden die unterschiedlichen Isotopomerenverteilungen der Ausgangsproben und der Probenmischung bzw. der Probenmischungen zur Berechnung der Proteinhäufigkeitsverhältnisse und die Auswirkungen eines Beeinflussungsmittels auf diese Verhältnisse bestimmt.

10

In einem ersten Schritt werden die Proteine mindestens einer Probe mit stabilen Isotopen markiert. Unter Markierung im Sinne der Erfindung wird das Einbringen von Elementen in die zu markierenden Proteine verstanden, die in dieser Zusammensetzung nicht natürlich vorkommen, oder in verschiedenen relativen Verhältnissen zu einander zwischen den
15 mindestens zwei Proben vorkommen. Unter Einbringen wird beispielsweise der Einbau, insbesondere bei der Biosynthese innerhalb von Zellen, markierter Aminosäuren in zu markierende Proteine und Peptide verstanden.

20

Die Markierung von Zellen kann vorteilhafterweise "*in vivo*" durch das Anzüchten der Zellen auf einem Medium erfolgen, das markierte Aminosäuren oder andere Quellen für die entsprechenden Elemente enthält. Die beispielsweise angereicherten Aminosäuren werden in die
25 Zellen aufgenommen und in die zu untersuchenden Zellproteine eingebaut. Die Aminosäuren können beispielsweise ^{15}N , ^{13}C , ^{18}O , ^{34}S und/oder $^2\text{H}_2$ enthalten. Eine Markierung "*in vitro*" ist gleichfalls möglich, beispielsweise durch Protein-Alkylierung.

30 In einem zweiten Schritt wird eine Proteinmischung bekannter Proteinmengen aus der ersten und der mindestens zweiten Probe

hergestellt. Eine Proteinmenge umfaßt alle in der Probe vorkommenden Proteine und wird durch herkömmliche Verfahren bestimmt.

In einem weiteren Schritt werden die Proteine der ersten Probe, der
5 Proteinmischung und der mindestens zweiten Probe mit Hilfe eines
Separationsmittels, insbesondere eines 2D-Gels, aufgetrennt. Die
Trennung der ersten Probe und der zweiten Probe sind nur dann
notwendig, wenn die Anreicherung von stabilen Isotopen in diesen
Proben sonst unbekannt ist. Man erhält dadurch eine Auftrennung der in
10 der Probe vorhandenen Proteine anhand von spezifischen
Proteineigenschaften. In Folge werden einzelne, durch die Separation
gefundene Proteine analysiert. Hierbei werden die Häufigkeiten
zugehöriger, sich entsprechender gleichartiger Proteine der ersten und
der mindestens zweiten Probe zueinander in Beziehung gesetzt.

15

Im einem nächsten Schritt werden die separierten Proteine durch
Verdau in Fragmente bzw. Peptide aufgespalten, wobei die
Fragmentierung auch bereits vorher durchgeführt worden sein kann.

20 Nachfolgend wird die Isotopomerenverteilung der Fragmente durch
MALDI-TOF-Massenspektrometrie ermittelt. Die
Isotopomerenverteilungen der Fragmente kann hochauflösend,
innerhalb enger Fehlergrenzen reproduzierbar ermittelt werden. Dies ist
eine Grundvoraussetzung des Verfahrens.

25

In einem letzten Schritt werden die Verhältnisse der Proteinhäufigkeiten
zwischen der ersten und der mindestens zweiten Probe aus den
ermittelten Isotopomerenverteilungen berechnet. Die Berechnung kann
mit Hilfe der Isotopomerenverteilungen jeweils eines sich
30 entsprechenden Fragments aus der ersten und der mindestens zweiten
Probe erfolgen. Die Berechnung kann auch mit Hilfe der
Isotopomerenverteilungen der jeweils sonst bekannten oder geschätzten

Stabilisotopanreicherungen jeder einzelnen Probe erfolgen. Es können auch mehrere Isotopomerenverteilungen von unterschiedlichen Fragmenten bzw. Peptiden eines Proteins zur Berechnung verwendet werden.

5

Die dargestellten Reihenfolgen der Schritte der erfindungsgemäßen Verfahren sind nur beispielhaft gewählt und nicht zwingend.

Das in [Vogt 1993] beschriebene Verfahren zur Bestimmung von
10 Isotopenanreicherungen unter Verwendung von Isotopomerenverteilungen kann beispielsweise direkt zur Berechnung der Verhältnisse der Proteinhäufigkeiten angewendet werden. Hierbei wird von der Tatsache Gebrauch gemacht, daß sich die natürliche Isotopomerenverteilung eines Moleküls bei einer künstlichen
15 Anreicherung des Moleküls mit Isotopen, die in dieser Häufigkeit in der Natur nicht vorkommen, spezifisch verschiebt.

Die Berechnung basiert vorteilhafterweise auf der Bestimmung der relativen Häufigkeiten von Peaks der Isotopomerenverteilung der
20 Proteine bzw. Peptide. Diese Peaks werden mit Integer-Werten ($i=0, \dots, n$) bezeichnet, die den Massen-Offset bezüglich des monoisotopischen Peaks ($i=0$) in Richtung zunehmender m/z -Werte beschreiben. Die monoisotopischen Peaks der Protein- bzw. Peptid-Moleküle sind die Peaks mit den niedrigsten m/z -Werten in einer
25 Isotopomerenverteilung. Die Isotopomerenverteilungen von Molekülen sind massenspektrometrische Abbildungen ihrer isotopologischen Verteilung M_i ($i=1..n$), wobei M_i Isotopologe mit dem gleichen Massen-Offset i bezeichnet.

30 Als Rechengrößen werden sogenannte RIA-Werte (Relative Isotopologue Abundance-Werte) verwendet, welche die relative Anzahl aller Isotopologe mit gleichem Massen-Offset i eines Proteins bzw.

Peptids bezogen auf die Summe aller massenspektrometrisch bestimmbarer Isotopologe des Proteins bzw. Peptids darstellen. Dementsprechend ergibt sich ein RIA-Wert eines Isotopologes M_i eines bestimmten Protein- bzw. Peptid-Fragments p durch:

5

$$RIA_{p,i} = \frac{S_{p,i}}{\sum_i S_{p,i}} \quad (1)$$

wobei $S_{p,i}$ ($i=0, \dots, n$) die massenspektrometrisch gemessenen Ionen-Signale sind, die aus einer Isotopomerenverteilung der n Peaks einer isotopologischen Verteilung eines Peptids p abgeleitet werden. Die Ionensignale werden aus Integralen über die entsprechenden Peaks bestimmt.

Wenn die molare Mengen eines isotopisch markierten Proteins mit L und die molare Menge eines Proteins in natürlich isotopischer Zusammensetzung mit N bezeichnet wird, ergibt sich der Molenbruch C eines Gemischs dieser Proteine durch:

15

$$C = L/(L+N) \quad (2)$$

20

Der Molenbruch C bestimmt sich gemäß [Vogt 1993] zu:

$$C_{p,i} = \frac{RIA_{p,i}(L+N) - RIA_{p,i}(N)}{RIA_{p,i}(L) - RIA_{p,i}(N)} \quad (3)$$

Durch Einsetzen der gemessenen Werte $RIA_{p,i}(L+N)$, $RIA_{p,i}(L)$ und $RIA_{p,i}(N)$ läßt sich der entsprechende Molenbruch $C_{p,i}$ berechnen, wobei $RIA_{p,i}(L+N)$ die RIA-Werte des Gemisch, $RIA_{p,i}(L)$ die RIA-Werte der markierten und $RIA_{p,i}(N)$ die RIA-Werte der natürlich vorkommenden Proteine bzw. Peptide sind.

25

Das molare Verhältnis $R = L/N$ ergibt sich aus:

$$R = \frac{L}{N} = \frac{C}{1-C} \quad (4)$$

5

Zur Bestimmung des Molenbruchs $C_{p,i}$ bzw. des molaren Verhältnisses lassen sich alle n Peaks der Isotopomerenverteilung verwenden. Man erhält also eine n -fache Redundanz, die zur Erhöhung der Genauigkeit verwendbar ist.

10

Die Verwendung von Isotopomerenverteilungen, die beispielsweise mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie hochauflösend und reproduzierbar ermittelt werden, zur Berechnung von Verhältnissen von Proteinhäufigkeiten, beispielsweise mit Hilfe des in [Vogt 1993] beschriebenen Verfahrens, ermöglicht die Bestimmung von Verhältnissen von Proteinhäufigkeiten (z. B. Quantifizierung) bzw. Mischungsverhältnissen mit niedrigen Isotopenanreicherungen, von beispielsweise ca. 20 %. Alle bisher veröffentlichten Methoden sind auf das Erreichen sehr hoher Isotopenanreicherungen ($> 90\%$) in einem Markierungsschritt angewiesen, um getrennte, überlagerungsfreie und definierte Isotopomerenverteilungen für markierte und unmarkierte Fragmente bzw. Peptide und möglichst vollständige Markierung aller vorgesehenen Markierungsstellen zu erzeugen [Gygi et al., 1999 und andere Gruppen].

25

Das hier beschriebene Verfahren ist um ein Vielfaches schneller und billiger als vergleichbare herkömmliche Verfahren, bei welchen Isotopenanreicherungen über 90 % benötigt werden. Es handelt sich daher um ein neues Verfahren, daß beträchtliche Vorteile gegenüber den bisher veröffentlichten Verfahren bietet.

30

Das erfindungsgemäße Verfahren hat den Vorteil, dass es keine Kenntnisse darüber voraussetzt, wie die Markierung in das Peptid und/oder Protein gelangt und ob es sich dabei um einen oder mehrere gleiche oder verschiedene Markierungen handelt. Außerdem spielt es
5 keine Rolle, in welchem Umfang die Markierung in den Proteinen oder Peptiden angereichert wird. Ausschlaggebend ist allein, daß sich die maßenspektrometrisch gemessenen Peptidfragment-Isotopomerenverteilungen der zu vergleichenden markierten und unmarkierten Proteine genügend unterscheiden, um auswertbar zu sein.

10

In einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung wird mindestens eine Probe vor der Herstellung der Proteinmischung mit mindestens einem Beeinflussungsmittel beeinflusst, insbesondere stimuliert. Die Probe stellt vorteilhafterweise eine biologische Probe dar, beispielsweise eine
15 Zellkultur oder ein Zellsystem. Die Probe kann auch ein Organismus oder ein Teil davon sein oder davon abstammen. Die Verhältnisse der Proteinhäufigkeiten sind ein Maß für die Auswirkung der Beeinflussung bzw. der Stimulation auf die Proteinhäufigkeiten. Auf diese Weise kann beispielsweise die Wirksamkeit eines Beeinflussungsmittels auf das
20 Zellwachstum untersucht werden. Analog kann mit Inhibition gearbeitet werden.

Die Erfindung umfaßt ferner ein Verfahren zur Bestimmung der Einbaurate von, mit stabilen Isotopen markierten, Substanzen,
25 insbesondere von Aminosäuren, in Proteine, welche von Zellen gebildet werden, mit folgenden Schritten:

- Mischen der markierten Substanzen mit den Zellen,
- Gewinnung von mindestens einer Proteinernte durch Entnahme der Proteine zu mindestens einem bestimmten Zeitpunkt,
- 30 - getrennte Separation der Proteine der jeweiligen Proteinernten mit Hilfe eines Separationsmittels, insbesondere eines 2D-Gels, gegebenenfalls in mehreren Schritten,

- 16 -

- gegebenenfalls Gewinnung von Fragmenten der separierten Proteine der jeweiligen Proteinernten durch spezifisches Spalten oder Verdau, insbesondere tryptischen Verdau, der Proteine vor der nach der Separation,
- 5 - Ermitteln der Isotopomerenverteilung der Fragmente der jeweiligen Proteinernten durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie und
- Berechnung der Einbaurrate der Substanz aus den ermittelten Isotopomerenverteilungen der jeweiligen Proteinernten.

10

Alternativ kann der Anreicherungsgrad aus einer Messung bestimmt werden, wenn Abweichungen von den natürlich vorkommenden oder anders erwarteten Isotopomerenverteilung beobachtet werden. Verschiedene Anreicherungsgrade in verschiedenen Proteinen weisen
15 auf verschiedenen Einbauraten hin.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die Einbaurrate von Substanzen, beispielsweise Aminosäuren, die mit stabilen Isotopen markiert sind, in Proteine bzw. Peptide berechnet. Unter Einbaurrate ist
20 die Veränderung der eingebauten Substanzmenge in einem Protein pro Zeiteinheit zu verstehen. Bei den Substanzen kann es sich beispielsweise um markierte Aminosäuren handeln. Die markierten Aminosäuren können in eine Zellprobe bzw. einen Zellpool eingebracht werden, wobei die Zellen der Probe ab dem Zeitpunkt des Einbringens
25 der Substanz, d. h. der markierten Aminosäuren, mit dem Einbau der Substanz in die zelleigenen Proteine bzw. Peptide beginnen.

In einem ersten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die markierten Substanzen mit den Proteinen gemischt. Ab diesem
30 Zeitpunkt kann es zu einem Einbau der Substanz mit einer zu bestimmenden Einbaurrate in die Proteine kommen.

In einem weiteren Schritt wird mindestens eine Proteinernte durch Entnahme der Proteine zu mindestens einem bestimmten Zeitpunkt gewonnen. Mit fortschreitender Zeit werden entsprechend der Einbaurrate zunehmend Substanzen in die Proteine eingebaut. Werden zu definierten Zeitpunkten Proteinernten bzw. Proteinproben entnommen, ist es möglich, anhand dieser Proteinernten die Einbaurrate zu bestimmen. Handelt es sich bei der zu untersuchenden Probe um eine markierte Zellprobe, werden Zellen aus der Probe entnommen, gewaschen und lysiert.

10

In einem nächsten Schritt werden die Proteine der jeweiligen Proteinernten mit Hilfe eines Separationsmittels, insbesondere eines 2D-Gels, separiert. Man erhält dadurch eine Auftrennung der in der Probe vorhandenen Proteine anhand von spezifischen Proteineigenschaften. In Folge werden einzelne, durch die Separation gefundene Proteine analysiert. Hierbei werden die Anreicherungen der Substanzen in den zugehörigen, sich entsprechenden gleichartigen Proteinen der zeitlich aufeinanderfolgenden Proteinernten zueinander in Beziehung gesetzt.

15

Nachfolgend werden Fragmente der separierten Proteine der jeweiligen Proteinernten durch spezifische Spaltung oder Verdau, insbesondere durch tryptischen Verdau, der Proteine gewonnen.

20

Danach wird die Isotopomerenverteilung der Fragmente der jeweiligen Proteinernten durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie ermittelt. Die Isotopomerenverteilungen der Fragmente kann hochauflösend, innerhalb enger Fehlergrenzen reproduzierbar, ermittelt werden. Dies ist eine Grundvoraussetzung des Verfahrens, da sich die Substanzanreicherung von Proteinernten zweier aufeinanderfolgenden Zeitpunkte, abhängig von der Einbaurrate und der Zeitdifferenz zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten, nur geringfügig unterscheiden kann.

25

30

- 18 -

In einem letzten Schritt wird die Einbaurate der Substanz aus den ermittelten Isotopomerenverteilungen der jeweiligen Proteinernten berechnet. Ist die Peptidsequenz bekannt und damit auch die vorhandenen Aminosäuren, kann die Einbaurate für spezifische
5 Aminosäuren berechnet werden.

Das in [Vogt 1993] beschriebene Verfahren zur Bestimmung von Isotopenanreicherungen unter Verwendung von Isotopomerenverteilungen kann beispielsweise direkt zur Berechnung
10 der Einbaurate der Substanz aus den ermittelten Isotopomerenverteilungen der jeweiligen Proteinernten angewendet werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Verfahren zur
15 Bestimmung der Einbauraten von markierten Substanzen in Proteine zur Bestimmung der Auswirkung einer Beeinflussung, insbesondere einer Stimulation, auf die Einbauraten gleichartiger Proteine in einer ersten und einer mindestens zweiten markierten Probe verwendet. Mindestens eine der Proben wird mit einem Beeinflussungsmittel beeinflusst. Die
20 Einbauraten der Substanz werden für die jeweilige Probe ermittelt und die Auswirkung der Beeinflussung wird durch Bildung des Verhältnisses der jeweiligen Einbauraten bestimmt.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Proteine durch
25 Aminosäuren markiert, die mit stabilen Isotopen angereichert wurden. Hierbei wird beispielsweise eine Zellkultur auf einem Medium gezüchtet, das mit Isotopen angereicherte Aminosäuren enthält. Hierbei kann es sich um gleiche oder verschiedene Aminosäuren mit gleichen oder verschiedenen Isotop-Markierungen handeln.

30 Bei weiteren bevorzugten Ausführungsformen sind die Isotope ^{15}N , ^{14}C , ^{13}C , ^{13}N , ^{18}O , ^{34}S und/oder $^2\text{H}_2$.

In besonders bevorzugten Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verfahren sind die Isotopenanreicherungen kleiner als 95 %, vorzugsweise kleiner als 90 %, insbesondere kleiner als 80 %, vorzugsweise kleiner als 40 % und besonders bevorzugt kleiner als 30 %. Bekannte Verfahren sind auf hohe Isotopenanreicherungen von beispielsweise größer als 90 % angewiesen, da beispielsweise eine Überlagerung der Isotopomerenverteilungen der natürlich vorkommenden Moleküle mit den Isotopomerenverteilungen der angereicherten Moleküle eine Analyse erschwert bzw. unmöglich macht. Durch die Kombination von MALDI-TOF-Massenspektrometrie in Verbindung mit beispielsweise dem in [Vogt 1993] beschriebenen Verfahren ist es erstmals möglich, derart geringe Isotopenanreicherungen auszuwerten. Ein wesentlicher Vorteil ist diese Tatsache auch bei der Bestimmung von Einbauraten, da hier zwischen zwei unterschiedlichen Meßzeitpunkten nur geringe Unterschiede in den Isotopenanreicherungen auftreten können.

Die Erfindung umfaßt ferner ein Verfahren zur Gewinnung von Informationen über Aminosäuresequenzen von Peptiden, bei dem die Informationen über die Aminosäuresequenzen mit Hilfe der durch hochauflösende Massenspektrometrie ermittelten Isotopomerenverteilung der Peptide gewonnen wird.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die Isotopomerenverteilung eines Peptids bzw. Proteins dazu benutzt, neben anderen spezifischen Parametern, beispielsweise der Peptidmasse, Informationen über Aminosäuresequenzen des Peptids zu gewinnen. Diese Informationen können als zusätzliche Information bei der Qualifizierung des zu untersuchenden Peptids verwendet werden. Beispielsweise kann in einem Peptid bei der Peptide-Mass-Fingerprint Methode neben dem

- 20 -

m/z-Wert die Isotopomerenverteilung als zusätzlicher unabhängiger Suchparameter verwendet werden.

- In einer Weiterbildung des Verfahrens betreffen die Informationen über die Aminosäuresequenzen die Aminosäuren-Sequenzzusammensetzung der Peptide. Stabilisotopangereicherte Peptide müssen stabilisotopangereicherte Aminosäuren enthalten. Wenn die Verteilung der Stabilisotope über alle Aminosäuren bekannt ist, so enthält die Isotopomerenverteilung der Peptide eines Proteins auch Aminosäuresequenzinformationen, weil die Stabilisotopinkorporation sequenzspezifisch ist. Dies trifft nicht nur für künstlich angereicherte Stabilisotope, sondern auch für natürlich vorkommende Stabilisotope, insbesondere in Anwesenheit von schwefelhaltigen Aminosäuren, zu.
- Die Anwesenheit der schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin in einem Peptid führt aufgrund der charakteristischen Isotopenverteilung des Elements Schwefel zu einer spezifischen Isotopomerenverteilungen derartiger Peptide. Das Element Schwefel besitzt die 4 stabilen Isotope ^{32}S (Häufigkeit 95 %), ^{33}S (0,75 %), ^{34}S (4,2 %) und ^{36}S (0,015 %). Der hohe Anteil des schweren Isotops ^{34}S von 4,2 % verschiebt den Schwerpunkt der Isotopomerenverteilungen von Cys- oder Met-haltigen Peptiden zu schwereren Massen hin. Wenn ^{34}S künstlich angereichert wird, wird dieser Effekt größer.
- Wird die Isotopomerenverteilung von Peptiden bestimmt, ist gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung die Detektion der Verschiebung des Schwerpunkts der Isotopomerenverteilung zu schwereren Massen ein Merkmal für die Anwesenheit von stabile Isotope enthaltenden, insbesondere schwefelhaltigen, Aminosäuren.

- 21 -

In einer Weiterbildung umfaßt die Erfindung ein Verfahren zur Verbesserung der Ionisationsfähigkeit von Peptiden und/oder Proteinen nach einem enzymatischen und/oder chemischen Verdau. Nach einem Verdau ergeben sich verschiedene entstehende Aminosäuren sowohl am C- wie N-terminalen Ende, welche aufgrund ihrer unterschiedlichen pK-Werte in ihrer Ionisationsfähigkeit stark variieren. Dabei sind im Falle eines beispielsweise tryptischen Verdau die Lysin-Peptide gegenüber den Arginin-Peptiden stark benachteiligt. Durch eine Modifikation der, vorzugsweise N- und C-terminalen, Aminosäuren, insbesondere im Bereich der Seitenketten, mit einer ersten Modifikationssubstanz wird die Ionisationseffizienz von, insbesondere lysinhaltigen, Peptiden gesteigert und die Stärke der Signale der massenspektrometrischen Untersuchung stark erhöht. Als derartige Substanzen werden beispielsweise O-Methylisoharnstoff oder Nicotinyln-hydroxysuccinimid [James 2000] sowohl für C- wie auch für N-terminale Modifikationen verwendet.

Die zu untersuchenden Moleküle, insbesondere Proteine und/oder Peptide, werden vor der massenspektrometrischen Untersuchung zunächst gereinigt und beispielsweise mit Hilfe eines Polyacrylamidgels aufgetrennt. Für die Modifikation von Aminosäuren wird durch Immobilisierung der Proteine oder Peptide, insbesondere in einer Polyacrylamidgelmatrix oder auf einem Umkehrphasenmaterial, eine hohe stöchiometrische Effizienz erhalten.

Die Erfindung umfaßt weiterhin ein Verfahren zur Identifikation von Molekülen, welche mindestens eine Phosphogruppe oder über ein Sauerstoffatom angebundene Kohlenhydrate enthalten, insbesondere Peptide und/oder Proteine, wie beispielsweise Phosphoserine oder Phosphothreonine. Durch das Verfahren werden schwefelhaltige Gruppen, vorzugsweise durch Michael-Addierung von schwefelhaltigen Nukleophilen oder durch beta-Eliminierung mindestens einer

- 22 -

Phosphogruppe, insbesondere durch nukleophile schwefelhaltige Reagenzien, welche mindestens eine Phosphogruppe verdrängen, eingeführt. Eine anschließende Detektion der Verschiebung des Schwerpunktes der Isotopomerenverteilung zu schweren Massen, 5 bedingt durch die Verdrängung der Phosphogruppe durch das schwefelhaltige Nukleophil, ist ein indirekter Nachweis für die Anwesenheit eines Phosphoproteins oder -peptids.

10 In einer Fortführung des Verfahrens wird die eingeführte schwefelhaltige Gruppe, insbesondere eine Sulfhydrylgruppe, durch eine leichter ionisierbare Gruppe in Form eines geeigneten Reagenz, vorzugsweise eines Alkylierungsmittel, insbesondere 3-(Acrylamidopropyl)-trimethylammoniumchlorid [Brune 1992] oder 1,1,3,3-Tetramethylguanidin, ersetzt und vereinfacht dadurch die Identifikation 15 phosphogruppenbeinhalten der Peptide und Proteine, insbesondere durch eine Erhöhung der Stärke der Signale bei der massenspektrometrischen Detektion und eine Verbesserung der Statistik bei höheren Isotopomeren.

20 Die negative Ladung beispielsweise einer Phosphatgruppe wird dadurch zu einer basischen Gruppe konvertiert. In einer Weiterbildung des Verfahrens, bei der die Michael-Addierung vor dem beispielsweise tryptischen Verdau stattfindet, können dadurch neue tryptische Spaltstellen eingeführt werden. Die Kombination von neuen Spaltstellen 25 und damit neuen Peptiden, zusammen mit einer isotopomerischen schwefel-spezifischen Signatur, identifiziert nach der Erfindung eindeutig das Vorhandensein und die Position der Phosphatgruppe. Wenn die Michael-Addierung mit einer Mischung von Reagenzien durchgeführt wird, wobei mindestens ein Reagenz eine positive Ladung einführt und 30 mindestens eines dieser Reagenzien keine positive Ladung einführt, so entstehen pro Phosphat zwei Peptide (= ein Peptidpaar) mit Massenunterschieden, die abhängig sind von dem Massenunterschied

- 23 -

der mindestens zwei verschiedenen Alkylierungsmoleküle: (1) von der tryptischen Spaltung nach der das Phosphat enthaltenden Aminosäure, (2) von der tryptischen Spaltung nach der am nächsten stehenden basischen Aminosäure. Diese Peptidpaare besitzen für alle
5 phosphatenthaltenden Peptide eine isotopomerische schwefelspezifische Signatur, die erfindungsgemäß auf das bei der Michael-Addierung eingeführte Reagenz zurückzuführen ist.

Die Erfindung bezieht sich auf die Analyse von Proben aus Proteinen
10 oder Gemischen von Proteinen oder fragmentierten Proteinen, bei denen die Isotopomeren-Verteilungen mit genügend großer Massenauflösung meßbar sind.

Bei der bereits bekannten Massenanalyse von Isotopomeren-Verteilungen (MIDA), beispielsweise beschrieben in Analytical biochemistry
15 267, 1-16 (1999), wird das Schicksal eines bestimmten Precursors, beispielsweise markiertes Leucin, verfolgt. Im Gegensatz zu den erfindungsgemäßen Verfahren ist es mit MIDA nicht möglich, mehr als einen markierten Precursor, also beispielsweise eine markierte
20 Aminosäure, zu verwenden. Die erfindungsgemäßen Verfahren haben dem gegenüber weiterhin den Vorteil, daß der oder die markierten Precursor auch in andere Aminosäuren metabolisiert werden können. Die hier offenbarten Verfahren unter Einsatz von RIA können mit mehr als einem Precursor eingesetzt werden. Durch den Vergleich von
25 beobachteten und zu erwartenden Isotopomer-Verteilungen können sie mit einer Probe durchgeführt werden. Darüber hinaus können mit diesen Verfahren qualitative und/oder quantitative Aussagen über Proteine von zwei oder mehr Proben gemacht werden, wobei für quantitative Aussagen vorzugsweise Proteinproben miteinander gemischt und ein
30 Massenspektrum dieses Gemisches analysiert wird.

- 24 -

Hierbei ist es unerheblich, von welcher Art das oder die stabilen Isotope sind, welche in die Peptide und/oder Proteine eingebaut werden oder auf welche Art und Weise die Markierung metabolisch ein- oder umgebaut wird. Hierdurch wird es ermöglicht, beispielsweise
5 kostengünstige stabile Isotopenquellen zu verwenden, wie beispielsweise Hefeextrakte, die mit ^{15}N markiert sind, wobei beispielsweise die Aminosäuren teilweise oder auch vollständig markiert sind. Derartige Isotopenquellen eignen sich beispielsweise zur Fütterung von Mäusen oder anderen Versuchstieren.

10

Die verschiedenen Isotopen-Muster der Ionen von verschiedenen Proben werden empirisch bestimmt, wodurch es möglich ist, (a) die Unterschiede zwischen zwei Proben durch Messung der relativen Isotopomeren-Abundanzen jeder Probe zu bestimmen und (b) die
15 Molfraktion von jeder Probe, also deren Verhältnis zueinander, durch Verwendung des Gemisches von zwei Proben zur massenspektrometrischen Messung zu quantifizieren.

Proteine oder Peptide, die erfindungsgemäß untersucht werden können,
20 bestehen aus Molekülen mit zwei oder mehr Aminosäuren, die durch eine oder mehrere Peptidbindungen mit Hilfe eines Ribosoms verbunden sind. Für die Zwecke der Erfindung können auch synthetische oder künstlich synthetisierte Polypeptide oder Proteine hergestellt werden, solange sie ebenfalls durch Ribosomen synthetisiert
25 werden. Es können also auch beispielsweise Translationssysteme eingesetzt werden, die auf Zellextrakten beruhen und so Proteine produzieren.

Die Erfindung umfaßt weiterhin ein Verfahren, bei dem wenigstens zwei
30 unterschiedlich markierte Proben analysiert werden. Vorzugsweise stammen die Proben aus komplexen biologischen Systemen, wie beispielsweise aus kultivierten Zellen, Organismen, Gewebe von

- 25 -

Organismen, zelluläre Fraktionen oder chromatographische Fraktionen von biologischen Systemen. Diese Proben bestehen im allgemeinen nicht aus einzelnen Proteinen, deren chemische Zusammensetzung bekannt wäre.

5

Ein wichtiger Aspekt der Erfindung ist, die Sensitivität von bestehenden Methoden zu erhöhen, um so die Analyse von verschiedenen Proteinen in Proteom-Anwendungen zu ermöglichen. Beispielsweise kann so die Antwort eines Systems, insbesondere eines komplexen biologischen Systems, auf experimentelle Behandlungen untersucht werden. Die erforderliche Empfindlichkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens ergibt sich u. a. aus den Beispielen in Kombination mit den Figuren.

Die Proben enthalten im allgemeinen verschiedene Proteine und/oder Protein-Isoformen. Diese Protein-Isoformen sind chemisch verschiedene Proteinarten, die von einer oder mehreren mRNA-Molekülen synthetisiert werden, wobei die mRNA-Moleküle von dem gleichen oder zumindest von hoch homologen Genen transkribiert werden. So umfassen Protein-Isoformen beispielsweise Proteine, die von unterschiedlich gespleißten mRNAs synthetisiert werden oder auch Proteine, die post-translational unterschiedlich modifiziert werden. Die erfindungsgemäß eingesetzten Proteine oder Protein-Isoformen werden an Ribosomen synthetisiert und sind nicht durch nicht-biologische, chemische Methoden synthetisch hergestellt. In dem Fall, daß synthetisch synthetisierte Polypeptide oder Proteine dieser Art zu den Proben zugegeben werden, deckt die Erfindung Verfahren ab, bei denen individuelle Protein-Abundanzen von nicht-synthetisch hergestellten Polypeptiden oder Proteinen in mindestens einer Probe bestimmt werden.

30

Im Gegensatz zur bekannten massenspektrometrischen Analyse von Isotopomeren-Verteilungen (MIDA) ist es vorteilhafterweise für das

erfindungsgemäße Verfahren nicht erforderlich, die Aminosäuresequenz der zu analysierenden Peptide oder Proteine zu kennen. Vielmehr ist das erfindungsgemäße Verfahren dazu geeignet, bisher völlig unbekannte, beispielsweise Cystein-enthaltende Peptide zu analysieren und insbesondere zu quantifizieren. Ein Ziel der Erfindung ist es, solche Proteine oder Peptide in den Proben zu detektieren, die unterschiedliche stabile Isotopen-Gehalte aufweisen und/oder diese Proteine in verschiedenen Proben bezüglich ihrer relativen Abundanz bzw. Häufigkeit zu differenzieren, um so eine relative Quantifizierung der Unterschiede in den Häufigkeiten zu ermöglichen. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Bereitstellung von Informationen über relative Änderungen in den Häufigkeiten eines einzelnen Proteins oder einer Gruppe von Proteinen zwischen verschiedenen Proben und die Veränderungen im proportionalen stabilen Isotopengehalt dieser Proteine, wie sie beispielsweise aus unterschiedlicher experimenteller Behandlung der biologischen Systeme resultiert, welche die Quelle für die Proben bereitstellen kann, die erfindungsgemäß analysiert werden.

Die verschiedenen Proben können ursprünglich identisch sein. Andererseits kann es sich bei dem Ursprung der Proben um experimentell äquivalente Kategorien der Probe handeln, wie beispielsweise unterschiedliche Tiere oder Gruppen von Tieren oder verschiedene Kulturen von kultivierten Zellen, die von einer Mutterkultur oder Gruppen einer Mutterkultur abstammen. Vor der Zellernte bzw. -entnahme werden die verschiedenen Proben, insbesondere die verschiedenen Zellkulturen oder Tiere bzw. Tiergruppen während des Verlaufes des Experiments unterschiedlich behandelt. Für Kontrollproben sollten die experimentellen Bedingungen entsprechend gewählt werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können die relativen stabilen Isotopengehalte bestimmt werden und so die relativen quantitativen Beziehungen zwischen verschiedenen multiplen Paaren oder Gruppen von Polypeptid-Ionen oder Protein-Ionen der selben chemischen
5 Struktur oder der selben monoisotopischen Masse von den verschiedenen Proben ermittelt werden. Besagte Ionen unterscheiden sich lediglich in ihrem stabilen Isotopen-Gehalt innerhalb der verschiedenen Proben. Eine oder mehrere Tochter-Ionen, wie beispielsweise tryptische Peptid-Ionen, von dem selben Protein in jeder Probe können benutzt
10 werden, um die Unterschiede im stabilen Isotop-Gehalt und/oder im Proteinhäufigkeitsverhältnis zwischen den Proben zu errechnen.

Die Proteine und/oder Peptide in den Proben können unterschiedlichen Markierungen mit stabilen Isotopen unterzogen werden, indem die
15 lebenden Systeme, insbesondere Zellen, vor, während oder nach der Behandlung metabolisch markiert werden. Die Reagenzien zur Markierung müssen hierbei nicht homogen sein. Die Proben können zusätzlich oder alternativ mit verschiedenen stabilen Isotopen markiert werden, indem beispielsweise Alkylierungsreagenzien mit
20 verschiedenen stabilen Isotopen-Gehalten zu den Proteinen bzw. Peptiden jeder Probe gegeben werden. Diese Alkylierungsreagenzien müssen nicht homogene stabile Isotopenverbindungen aufweisen. Für die Markierung können verschiedene stabile isotopische Elemente in einer Probe kombiniert werden, beispielsweise ^2H , ^{13}C und/oder ^{15}N .
25 Diese verschiedenen isotopischen Elemente können in die verschiedenen chemischen Verbindungen der Proteine und/oder Peptide eingebaut werden.

Gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren kann die tatsächliche oder
30 angebliche Aminosäuresequenz der analysierten Ionen beispielsweise durch Peptid-Massen-Fingerprinting oder durch Messung der Massen der Fragmente analysierter Ionen identifiziert werden. Weiterhin kann

auch die Verteilung der stabilen Isotope über bestimmte Aminosäuren durch rechnerische Simulation ermittelt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Ionen während der
5 Massenspektrometrie fragmentiert, um Tochter-Ionen zu generieren, die
in ihren Massen durch Bestandteile voneinander abweichen, die über
Peptidbindungen mit dem Ion verbunden sind, wie beispielsweise
Aminosäuren, posttranslational modifizierte Aminosäuren oder andere
chemisch modifizierte Aminosäuren. Beispielsweise wird hierfür eine
10 Fragmentation durchgeführt, die auf einer Kollision in MS/MS-Analysen
basiert oder aber auf einer „post source decay fragmentation“ nach einer
MALDI-Ionisierung beruht. Eine Analyse der Isotopomeren-Verteilungen
der Tochter-Ionen ermöglicht eine Bestimmung der stabilen
Isotopengehalte von jeder Aminosäure in den Polypeptid-Ionen aus
15 jeder einzelnen Probe.

Vorteilhafterweise kann eine oder mehrere Änderungen in dem stabilen
Isotopengehalt der Proteine oder Peptide in Kombination mit
Informationen aus anderen Quellen genutzt werden, um die Antwort des
20 biologischen Systems auf die experimentellen Bedingungen zu
interpretieren. Beispielsweise kann die möglicherweise beobachtete
höhere Häufigkeit von stabilen Isotopen in einem oder mehreren
Proteinen, welche bekanntermaßen in einer Streßantwort involviert sind,
einen gegensätzlichen Effekt oder eine toxische Antwort auf eine
25 bestimmte experimentelle Behandlung bei bestimmten Zellen in dem
System indizieren. Weiterhin kann beispielsweise eine Veränderung in
dem Gehalt der stabilen Isotope in einem oder mehreren Proteinen, die
vermutlich bei der Redox-Regulation eine Rolle spielen, eine oxidative
Streß- oder hydroxische Reaktion des Systems auf die Behandlung
30 anzeigen. Dieser Aspekt der Erfindung betrifft neben dem
erfindungsgemäßen Verfahren bezüglich quantitativer Aussagen auch
das erfindungsgemäße Verfahren bezüglich qualitativer Aussagen. Für

- 29 -

das erfindungsgemäße Verfahren hinsichtlich quantitativer Aussagen werden die Ergebnisse bezüglich der Abundanzen von einem oder mehreren Proteinen in Kombination mit Informationen von anderen Quellen ausgewertet, um so die Antwort des biologischen Systems auf
5 die experimentellen Bedingungen zu interpretieren.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist in besonderer Weise dazu geeignet, zwei oder mehr Proteine oder Peptide in einer oder mehreren Proben zu untersuchen. Vorteilhafterweise können beispielsweise sogar
10 mehr als 10 oder sogar mehr als 100 verschiedene Proteine in einer oder mehreren Proben erfindungsgemäß analysiert werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das erfindungsgemäße Verfahren in automatisierter Weise, beispielsweise
15 unter Einsatz von Robotern oder ähnlichem durchgeführt. Diese automatisierte Vorgehensweise kann beispielsweise für die Vorbereitung der Proben, die Trennung der Proben, die Fragmentierung der Proben und/oder die Durchführung der massenspektrometrischen Analyse eingesetzt werden, wodurch vorteilhafterweise der Probendurchsatz
20 erhöht wird und damit im allgemeinen natürlich die Kosten gesenkt werden.

Die genannten Merkmale und weitere Merkmale der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung von Experimenten in
25 Verbindung mit den Unteransprüchen und Figuren. Hierbei können die Einzelmerkmale jeweils für sich oder zu mehreren in Kombination miteinander verwirklicht sein.

In den Abbildungen zeigen:

- 30 -

- Abb. 1: Mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie gemessene Isotopomerenverteilung eines Peptids mit einer Masse von ca. 840 DA,
- 5 Abb. 2: Mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie gemessene Isotopomerenverteilung eines Peptids mit einer Masse von ca. 1.570 DA,
- 10 Abb. 3: Mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie gemessene Isotopomerenverteilung eines Peptids mit einer Masse von ca. 2.200 DA,
- Abb. 4: Mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie gemessene Isotopomerenverteilung eines Peptids mit einer Masse von
15 ca. 3.300 DA,
- Abb. 5 und 6:
20 Die Abbildungen zeigen Peptide aus unterschiedlichen Massenbereichen der zum gleichen Protein gehörigen Massenspektren aus einem Zellpool A, einem Zellpool B und aus einer Mischung AB.

Methoden

Die in den folgenden Experimenten verwendeten Schritte bzw. Methoden sind mit Hilfe von Buchstaben bezeichnet, auf die
5 nachfolgend Bezug genommen wird.

a) ist eine veröffentlichte Methode: Oda et al., 1999; Pasa-Tolic et al., 1999; Smith et al., 2001.

10 b), c), d) and e1) sind 'state of art' Methoden: Kellner, Lottspeich, Meyer, Microcharacterization of Proteins, Wiley-VCH, 1999; Schrattenholz (Hrsg.), Methoden der Proteomforschung, Spektrum Verlag, 2001.

e2) ist die Grundvoraussetzung für die hier beschriebenen Verfahren.
15 Diese Grundvoraussetzung wurde durch eigene Messungen gefunden und auch nachgewiesen.

f) ist eine veröffentlichte Methode: Vogt et al., 1993.

20 Die Anwendung von f) auf e), d. h. die Verwendung der Isotopomerenverteilungen von MALDI-TOF-Spektren zur Berechnung von Mischungsverhältnissen normaler und schwach ^{15}N (bzw. ^{13}C)-angereicherter Proteine, wurde ebenfalls durch eigene Messung gefunden und bestätigt.

25

Als Massenspektrometer wurde ein Autoflex 3 der Firma Bruker Daltonics verwendet.

Experiment 1:Bestimmung von Massenspektren von Peptiden mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie.

- 5 Die mit MALDI-TOF gemessenen Massenspektren von Peptiden mit Massen von z. B. ca. 840, 1.570, 2.200 und 3.300 zeigen die in Abb.1 bis Abb. 4 gezeigten, typischen Isotopomerenverteilungen. Diese Verteilungen kommen durch die Existenz von schweren Isotopen der Elemente zustande, aus denen die Peptide aufgebaut sind. Den größten
10 Einfluß haben dabei die relativ häufigen schweren Isotope der Elemente Kohlenstoff ($C^{13} = 1,1 \%$) und Stickstoff ($N^{15} = 0,37 \%$).

Experiment 2:

- 15 Reproduzierbarkeit von mit MALDI-TOF gemessenen Isotopomerenverteilungen.

Beim Verdau der separierten Proteine wird das Enzym Trypsin verwendet. Trypsin verdaut aber nicht nur die Proteine sondern auch
20 sich selbst, d. h. bei jedem Verdau entstehen spezifische Trypsinfragmente. Diese Trypsinfragmente haben definierte Massen (z. B.: 842.5, 2.211, 2.283, 1.045) und dienen in MALDI-TOF-Spektren von tryptisch verdauten Proteinen zur Eichung der Massenskala. Sie eignen sich daher besonders zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit von
25 Isotopomerenverteilungen mit Hilfe von MALDI-TOF.

Getestet wurde die Übereinstimmung bzw. Reproduzierbarkeit von jeweils 100 Isotopomerenverteilungen der Trypsinfragmente der Massen 842.5, 2.211, 2.283, 1.045. Die Verteilungen stimmen innerhalb einer
30 Schwankung von $\pm 5 \%$ miteinander überein. Die mittleren Verteilungen stimmen innerhalb dieses Fehlers auch mit den theoretischen Isotopomerenverteilungen der Trypsinfragmente überein.

- 33 -

Die Methode wurde außer für Trypsinfragmente auch für BSA-Fragmente verifiziert.

5 **Experiment 3:**

Isotopomerenverteilungen von Peptiden aus MALDI-TOF Massenspektren enthalten Informationen über die Proteinsequenz der Peptide.

- 10 Untersucht wurden die Isotopomerenverteilungen, die durch die Anwesenheit der schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin zustandekommen.

Das Element Schwefel besitzt die 4 stabilen Isotope ^{32}S (Häufigkeit 95
15 %), ^{33}S (0,75 %), ^{34}S (4,2 %) und ^{36}S (0,015 %). Der hohe Anteil des schweren Isotops ^{34}S von 4,2 % verschiebt den Schwerpunkt der Isotopomerenverteilungen von C- oder M-haltigen Peptiden zu schwereren Massen hin.

- 20 Die Ergebnisse zeigen, daß die durch schwere Schwefelisotope hervorgerufenen Isotopomerenverteilungsverschiebungen mit MALDI-TOF immer dann eindeutig nachgewiesen werden können, wenn das C- bzw. M-haltige Peptid überlagerungsfrei mit genügend hoher Auflösung gemessen werden kann.

25

Experiment 4:

Relative Quantifizierung von zellulären Proteinhäufigkeiten mit Hilfe von stabilen Isotopen (2-Pool Methode).

30

Zellpool A: markierte Zellen

Zellpool B: unmarkierte Zellen

- 34 -

- a) Die Zellen aus Zellpool A werden in einem Medium gezüchtet, das ^{15}N (bzw. ^{13}C)-angereicherte Aminosäuren enthält. Die ^{15}N -angereicherten Aminosäuren werden von den Zellen aufgenommen und in die Zellproteine eingebaut.
- 5 b) Stimulation der unmarkierten Zellen aus Zellpool B.
- c) Mischung AB: Mischung gleicher Proteinmengen aus Zellpool A und Zellpool B.
- d1) Die Separation der Proteine aus Zellpool A, Zellpool B und Mischung AB geschieht mittels 2D-Gel-Elektrophorese.
- 10 d2) In-Gel tryptischer Verdau der separierten Proteine.
- e1) Messung der ^{15}N (bzw. ^{13}C)-Anreicherungen der Proteine an Peptiden, die aus dem tryptischen Verdau der Proteine gewonnen werden (MALDI-TOF-Verfahren). Als Ergebnisse erhält man die m/z-Werte und die Isotopomerenverteilungen der Peptide.
- 15 e2) Mit MALDI-TOF werden die Isotopomerenverteilungen der Peptide sehr reproduzierbar nachgewiesen.
- f) Aus den Isotopomerenverteilungen sich entsprechender tryptischer Proteinfragmente aus Zellpool A, Zellpool B und Mischung AB werden die Proteinmischungsverhältnisse P_M berechnet. Mischungsverhältnisse
- 20 $P_M > 1$ bzw. $P_M < 1$ sind ein Maß für die Auswirkung der Stimulation auf die Proteinhäufigkeiten.
- Der Meßbereich $P_M = 0.1$ bis $P_M = 10$ kann noch mit einem Fehler $\leq \pm 10$ % bestimmt werden.

25

Experiment 5:

Relative Quantifizierung von zellulären Proteinhäufigkeiten mit Hilfe von stabilen Isotopen (3-Pool Methode).

- 30 Zellpool A: markierte Zellen
Zellpool B: unmarkierte Zellen
Zellpool C: unmarkierte Zellen

- 35 -

- a) Die Zellen aus Zellpool A werden in einem Medium gezüchtet, das ^{15}N (bzw. ^{13}C)-angereicherte Aminosäuren enthält. Die ^{15}N -angereicherten Aminosäuren werden von den Zellen aufgenommen und in die Zellproteine eingebaut. Von Zellpool A wird eine größere Menge zur
- 5 Durchführung mehrerer Stimulationsexperimente gezüchtet. Diese Menge kann auch als Referenz in weiteren Experimenten und/oder zur Herstellung eines Testsets verwendet werden.
- b) Stimulation der unmarkierten Zellen aus Zellpool B.
- c1) Mischung AB: Mischung gleicher Proteinmengen aus Zellpool A und
- 10 Zellpool B.
- c2) Mischung AC: Mischung gleicher Proteinmengen aus Zellpool A und Zellpool C.
- d1) Die Separation der Proteine aus Zellpool A, Zellpool B, Zellpool C, Mischung AB und Mischung AC geschieht mittels 2D-Gel-Elektrophorese.
- 15 d2) In-Gel tryptischer Verdau der separierten Proteine.
- e1) Messung der ^{15}N (bzw. ^{13}C)-Anreicherungen der Proteine an Peptiden, die aus dem tryptischen Verdau der Proteine gewonnen werden (MALDI-TOF-Verfahren). Als Ergebnisse erhält man die m/z-
- 20 Werte und die Isotopomerenverteilungen der Peptide.
- e2) Mit MALDI-TOF werden die Isotopomerenverteilungen der Peptide sehr reproduzierbar nachgewiesen.
- f) Aus den Isotopomerenverteilungen sich entsprechender tryptischer Proteinfragmente aus Zellpool A, Zellpool B, Zellpool C, Mischung AB
- 25 und Mischung AC werden die Proteinmischungsverhältnisse P_M berechnet. Mischungsverhältnisse $P_M > 1$ bzw. $P_M < 1$ sind ein Maß für die Auswirkung der Stimulation auf Proteinhäufigkeiten.

Der Meßbereich $P_M = 0.1$ bis $P_M = 10$ kann noch mit einem Fehler $\leq \pm 10$

30 % bestimmt werden.

Experiment 6:

Quantifizierung von zellulären Proteinumsatzraten bzw. von Einbauraten mit Hilfe von stabilen Isotopen.

- 5 Zellpool A: markierte Zellen
Zellpool B: markierte stimulierte Zellen
- a) Die Zellen aus Zellpool A werden zu einem Zeitpunkt t_0 in ein Medium gebracht, das ^{15}N (bzw. ^{13}C)-angereicherte Aminosäuren enthält. Die ^{15}N -angereicherten Aminosäuren werden ab dem Zeitpunkt t_0 von den
- 10 Zellen aufgenommen und in die Zellproteine eingebaut.
- b) Die Zellen aus Zellpool B werden zu einem Zeitpunkt t_0 in ein Medium gebracht, das die stimulierende Substanz und ^{15}N (bzw. ^{13}C)-angereicherte Aminosäuren enthält. Die ^{15}N -angereicherten Aminosäuren werden ab dem Zeitpunkt t_0 von den Zellen aufgenommen
- 15 und in die Zellproteine eingebaut.
- c) Zellernten: $A_{t_0}, A_{t_1}, A_{t_2}, A_{t_3}, \dots$ und $B_{t_0}, B_{t_1}, B_{t_2}, B_{t_3}, \dots$
Zu bestimmten Zeitpunkten $t_1, t_2, t_3, \dots > t_0$ werden die Zellen aus den Kulturmedien entfernt, gewaschen und lysiert.
- d1) Proteinseparation mittels 2D-Gel-Elektrophorese.
- 20 d2) In-Gel tryptischer Verdau der separierten Proteine.
- e1) Messung der ^{15}N (bzw. ^{13}C)-Anreicherungen der Proteine an Peptiden, die aus dem tryptischen Verdau der Proteine gewonnen werden (MALDI-TOF-Verfahren). Als Ergebnisse erhält man die m/z -Werte und die Isotopomerenverteilungen der Peptide.
- 25 e2) Mit MALDI-TOF werden die Isotopomerenverteilungen der Peptide sehr reproduzierbar nachgewiesen.
- f1) Aus den Isotopomerenverteilungen entsprechender tryptischer Proteinfragmente aus den Zellernten $A_{t_0}, A_{t_1}, A_{t_2}, A_{t_3}, \dots$ wird die normale Einbaurate $E_N = \Delta^{15}\text{N} / \Delta t$ des stabilen Isotops ^{15}N (bzw. $E_N = \Delta^{13}\text{C} / \Delta t$ für ^{13}C) in die Proteine berechnet.
- 30 f2) Aus den Isotopomerenverteilungen der tryptischen Proteinfragmente aus den Zellernten $B_{t_0}, B_{t_1}, B_{t_2}, B_{t_3}, \dots$ wird die Einbaurate unter

- 37 -

Stimulation $E_S = \Delta^{15}\text{N} / \Delta t$ des stabilen Isotops ^{15}N (bzw. $E_S = \Delta^{13}\text{C} / \Delta t$ für ^{13}C) in die Proteine berechnet.

f3) Aus dem Vergleich der Einbauraten E_N versus E_S wird die Auswirkung der Stimulation auf die Proteinumsatzrate berechnet.

5

Experiment 7:

Relative Quantifizierung der Proteinhäufigkeiten von murinen Stammzellen mit Hilfe des stabilen Isotops ^{15}N .

10

Das Experiment wurde an murinen Stammzellen durchgeführt. Die Bezeichnung der einzelnen Schritte wird entsprechend der vorhergehenden Experimente gemacht. In einem Schritt a) wurden die Proteine von Zellpool A in ^{15}N (ausgehend von der natürlichen ^{15}N -Isotopenhäufigkeit 0,37 %) auf ca. 25 % angereichert. Zellpool B bestand aus Stammzellen mit natürlicher Isotopenzusammensetzung. Nach der Durchführung der Schritte b) – d) wurden in e1) und e2) die MALDI-Spektren der tryptisch verdauten Proteine von Zellpool A, Zellpool B und Mischung AB gemessen. Ein Ergebnisbeispiel ist in den Abb. 5 und 6 gezeigt. Die Abbildungen zeigen Peptide aus unterschiedlichen Massenbereichen der zum gleichen Protein gehörigen Massenspektren aus Zellpool A, Zellpool B und aus der Mischung AB. Aus den MALDI-Spektren aus den Abbildungen 5 und 6 wurde mit Hilfe von f) ein Mischungsverhältnis von 1,1:1 mit einer Standardabweichung von $\pm 6\%$ für die Mischungsanteile von Zellpool A und Zellpool B in der Mischung AB berechnet. Dies bestätigt innerhalb der Fehlergrenzen das experimentell aufgrund von Pipettierung eingestellte Mischungsverhältnis von 1:1.

30

Experiment 8:**Untersuchung von Proteinen des Gehirns in Mäusen.**

5

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt die Detektion von sehr geringen Mengen von stabilen Isotopen in Proteinen, wodurch das folgende Experiment ermöglicht wird.

- 10 Mäuse werden mit stabilen Isotop-markierten Aminosäuren gefüttert. Im Prinzip kann die Diät eine oder mehrere Aminosäuren der 20 vorkommenden Aminosäuren enthalten. Die markierte Aminosäure kann hierbei vorteilhafterweise zu 99 % mit der stabil markierten Aminosäure angereichert sein. In diesem Versuch wird D10-Leucin eingesetzt,
- 15 welches nur minimal in andere Produkte metabolisiert wird und einen Massenshift von 10 pro Leucin induziert.

- Der Aminosäurepool, der für die Proteinsynthese in der Maus verfügbar ist, speist sich aus dem mit dem Futter aufgenommenen Material und
- 20 dem Abbau von existierenden Proteinen in Aminosäuren. Da die Biomasse der Proteine in der Maus groß ist, ist eine Inkorporation von mehr als 90 % in neue Proteine schwer zu erreichen.

- Die neu synthetisierten Proteine sind chemisch nicht von den bereits
- 25 existierenden Proteinen unterscheidbar, die keine markierten stabilen Isotope enthalten. Daher werden die stabilen Isotope im Stadium des Aminosäurepools und im Stadium des Gemischs mit den existierenden Proteinen verdünnt.

- 30 Nach Beginn der Diät mit den stabilen Isotopen wird die Maus stimuliert. Hierfür wird die Maus einem Lernprogramm unterzogen. Der Lernprozeß ist mit der Synthese von neuen Proteinen in bestimmten Regionen des

- 39 -

Gehirns, insbesondere dem Hypocampus, assoziiert. Daher ist ein Lernprogramm mit dem Beeinflussungsmittel gemäß der vorherigen Beschreibung im allgemeinen Teil gleichzusetzen.

- 5 Nach dem Lernprozeß der mit den markierten Aminosäuren gefütterten Mäuse wird der Hypocampus extrahiert und die verschiedenen Proteine über ein 2D-PAGE separiert. Anschließend werden die Proteine fragmentiert. Die Analyse erfolgt in Hinblick auf Proteine, die in den Mäusen des Lernprogramms mehr stabile Isotope enthalten als in den
- 10 Mäusen ohne Lernprogramm. Die Detektion von vermehrten stabilen Isotopen in einem bestimmten Protein indiziert eine translationale Hochregulierung des Proteins als Reaktion auf den Stimulus, also auf das Lernen.
- 15 Angenommenerweise beträgt der Anstieg für ein bestimmtes Protein 10 %, und dieses neu synthetisierte Protein weist 50 % Markierungseffizienz auf. Daraus folgt, daß der Anstieg des stabilen Isotops in den Pool dieses Proteins 5 % ausmacht. Unter diesen Umständen ist weder ein 2D-PAGE noch konventionelle
- 20 Massenspektrometrie-Quantifizierung in der Lage, diese Veränderung zu detektieren. Das erfindungsgemäße Verfahren hingegen kann dieses Protein, welches in der Antwort auf den Stimulus involviert ist, identifizieren.

Literatur

Conrads T.P., Alving K., Veenstra T.D. et al.; Quantitative analysis of bacterial and mammalian proteomes using a combination of cysteine
5 affinity tags and ¹⁵N-metabolic labeling. *Analytical Chemistry*, 13, 2.132-2.139, 2001.

Gygi S.P., Rist B., Gerber S.A., Turecek F., Gelb M.H., Aebersold R.; Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded
10 affinity tags. *Nature Biotech.*, 77, 994-999, 1999.

Kellner, Lottspeich, Meyer; *Microcharacterization of Proteins*; Wiley-VCH, Weinheim, 1999.

15 Mann M.; Quantitative proteomics? *Nature Biotechnology*, 17, 954-955, 1999.

Oda Y., Huang K., Cross F.R., Cowburn D., Chait B.T.; Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation.
20 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 6.591-6.596, 1999.

Pasa-Tolic L., Jensen P.K., Anderson G.A., Lipton M.S., Peden K.K., Martinovic S., Tolic N., Bruce J.E., Smith R.D.; High throughput proteome-wide precision measurements of protein expression using
25 mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 7.949-7.950, 1999.

Quadroni M. and James P.; Enhancing high-throughput proteome analysis: the impact of stable isotope labeling. In: Pennington S.R. and Dunn M.J. (Hrsg.) *Proteomics*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, 2001.

30

Russel D.H. and Edmondson R.D.; High-resolution mass spectrometry and accurate mass measurements with emphasis on the

- 41 -

characterization of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrometry*, 32, 263-276, 1997.

- 5 Schrattenholz; Methoden der Proteomforschung; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2001.

- Smith R.D., Pasa-Tolic L., Lipton M.S., Jensen P.K., Anderson G.A., Shen Y., Conrads T.P., Udseth H.R., Harkewicz R., Belov M.E.,
10 Masselon C., Veenstra T.D.; Rapid quantitative measurements of proteomes by fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Electrophoresis*, 22, 1.652-1.668, 2001.

- Veenstra T.D., Martinovic S., Anderson G.A., Pasa-Tolic L. and Smith
15 R.D.; Proteome analysis using selective incorporation of isotopically labeled amino acids. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 11, 78-82, 2000.

- Vogt J.A., Chapman T.E., Wagner D.A., Young V.R. & Burke J.F.;
Determination of the isotope enrichment of one or a mixture of two
20 stable labeled tracers of the same compound using the complete isotopomer distribution of an ion fragment; theory and application to in vivo human tracer studies. *Biological Mass Spectrometry*, 22, 600-612, 1993.

- 25 Chen, X., Smith, L.M. & Bradbury, E.M. Site-specific mass tagging with stable isotopes in proteins for accurate and efficient protein identification. *Anal Chem.*, 72, 1.134-1.143, 2000.

- Ong, S.-E. et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics.
30 *Mol Cell Proteomics* 1: 376-386 (2002).

- 42 -

Pratt, J.M. et al. Stable isotope labeling in vivo as an aid to protein identification in peptide mass fingerprinting. *Proteomics*, 2, 157-163, 2002.

- 5 L'Annunziata M.F. (Editor), *Handbook of Radioactivity Analysis*. Academic Press, London. ISBN 0124362559, 771 pages, 1998.

- Münchbach, M., Quadroni, M., Miotto, G., James, P. Quantitation and facilitated de novo sequencing of proteins by isotopic N-terminal labeling
10 of peptides with a fragmentation-directing moiety. *Anal Chem.* 72, 4.047-4.057, 2000.

Brune, DC Alkylation of cysteine with acryl amide for protein sequence analysis. *Anal Biochem.*, 207, 285-290, 1992.

15

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung des Verhältnisses der Proteinhäufig-
5 keiten gleichartiger Proteine in einer ersten (a) und einer
mindestens zweiten (b) Probe, mit den Schritten:
 - Markieren der Proteine mindestens einer Probe mit stabilen
Isotopen,
 - Herstellung einer Proteinmischung (c) bekannter
10 Proteinmengen aus der ersten (a) und der mindestens
zweiten (b) Probe,
 - getrennte Separation der Proteine der ersten Probe (a), der
Proteinmischung (c) und der mindestens zweiten Probe (b)
mit Hilfe eines Separationsmittels, insbesondere eines 2D-
15 Gels,
 - Ermitteln der Isotopomerenverteilung der Proteine aus den
Proben (a), (b) und (c) durch Massenspektrometrie,
insbesondere durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie, und
 - Berechnung der Verhältnisse der Proteinhäufigkeiten
20 zwischen der ersten (a) und der mindestens zweiten (b)
Probe aus den ermittelten Isotopomerenverteilungen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die
25 Proteine der Proben vor oder nach der Separation fragmentiert
werden, insbesondere durch spezifische Spaltung oder Verdau
der Proteine.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß
30 die Proben aus einem in vivo-System stammen, insbesondere ein
in vivo-System sind.

4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Markieren in vivo erfolgt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Probe vor der Herstellung der Proteinmischung mit mindestens einem Beeinflussungsmittel beeinflusst, insbesondere stimuliert wird.
- 10 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Beeinflussungsmittel eine Veränderung der Syntheserate von mindestens einem Protein in der Probe bewirkt.
- 15 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, insbesondere zur Bestimmung der Einbaurate von mit stabilen Isotopen markierten Substanzen, insbesondere von Aminosäuren, in Proteine mit den Schritten:
 - Mischen der markierten Substanzen mit den Zellkulturen,
 - Gewinnung von mindestens einer Proteinernte durch Entnahme der Proteine zu mindestens einem bestimmten
 - 20 Zeitpunkt,
 - getrennte Separation der Proteine der jeweiligen Proteinernten mit Hilfe eines Separationsmittels, insbesondere eines 2D-Gels,
 - gegebenenfalls Gewinnung von Fragmenten der separierten
 - 25 Proteine der jeweiligen Proteinernten durch spezifische Spaltung oder Verdau, insbesondere tryptischen Verdau, der Proteine vor oder nach der Separation,
 - Ermitteln der Isotopomerenverteilung der Fragmente der jeweiligen Proteinernten durch Massenspektrometrie,
 - 30 insbesondere MALDI-TOF-Massenspektrometrie und

- 45 -

- Berechnung der Einbaurrate der Substanz aus den ermittelten Isotopomerenverteilungen der jeweiligen Proteinernnten.

5 8. Verwendung des Verfahrens nach Anspruch 7 zur Bestimmung der Auswirkung mindestens einer Beeinflussung, insbesondere einer Stimulation, auf die Proteinhäufigkeitsverhältnisse gleichartiger Proteine in einer ersten und einer mindestens zweiten markierten Probe, wobei mindestens eine der Proben mit
10 mindestens einem Beeinflussungsmittel beeinflusst wird, dadurch gekennzeichnet, daß die Einbauraten der Substanz für die jeweilige Probe ermittelt werden und die Auswirkung der Beeinflussung durch Bildung des Verhältnisses der jeweiligen Einbauraten bestimmt wird.

15 9. Verfahren zur Bestimmung der Anreicherung von stabilen Isotopen in Molekülen, insbesondere in Proteinen oder Peptiden, dadurch gekennzeichnet, daß die Isotopomerenverteilung der Moleküle durch Massenspektrometrie ermittelt und die
20 Anreicherung der stabilen Isotope durch Vergleich der ermittelten Isotopomerenverteilung mit mindestens einer Referenzverteilung der Moleküle berechnet wird.

25 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Referenzverteilung die theoretische, insbesondere natürlich vorkommende Isotopomerenverteilung der Moleküle ist.

30 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Molekülzusammensetzung auf Basis des Massen-Fingerprints der Moleküle ermittelt und die theoretische Isotopomerenverteilung der Moleküle rechnerisch anhand der Molekülzusammensetzung und/oder mit Hilfe einer Datenbank bestimmt wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Referenzverteilung aus nicht angereicherten Molekülen und/oder angereicherten Molekülen mit bekannter Anreicherung bestimmt wird.
13. Verfahren zur Bestimmung der unterschiedlichen Anreicherung von stabilen Isotopen in Proteinen, Peptiden und/oder deren Fragmenten in unterschiedlichen Proben, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäuren und/oder die Fragmente der Proteine und/oder Peptide durch Hydrolyse und anschließende Chromatographie gewonnen, die Isotopenzusammensetzung der Aminosäuren und/oder der Fragmente bestimmt und aus den bestimmten Isotopenzusammensetzungen die durchschnittliche Anreicherungsrate bestimmt wird.
14. Verwendung oder Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine durch Aminosäuren, die mit stabilen Isotopen angereichert wurden, markiert werden.
15. Verwendung oder Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Isotope ^{15}N , ^{14}C , ^{13}C , ^{18}O , ^{34}S und/oder $^2\text{H}_2$ sind.
16. Verwendung oder Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Isotopenanreicherungen, insbesondere der Markierungsgrad in den gemessenen markierten Peptiden und/oder Proteinen, kleiner als 95 %, vorzugsweise kleiner als 90 %, insbesondere kleiner als 80 %, insbesondere kleiner als 30 %, sind.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Ionisationsfähigkeit von zu untersuchenden Molekülen, insbesondere Proteinen und/oder Peptiden, durch Modifikation der Moleküle mit einer ersten Modifikationssubstanz erhöht wird.
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Modifikationssubstanz O-Methyl-isoharnstoff ist.
19. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Modifikationssubstanz Nicotiny-N-hydroxysuccinimid ist.
20. Verfahren zum Nachweis von Molekülen, insbesondere Phosphoproteine und/oder Phosphopeptide, die mindestens eine Phosphogruppe enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß die Phosphogruppe der Moleküle durch Schwefel, bevorzugt schwefelhaltige Alkylgruppen, ersetzt wird und der Nachweis durch die Verschiebung des Schwerpunkts der Isotopomerenverteilung der Moleküle zu schwereren Massen hin erfolgt.
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Ionisationsfähigkeit der Moleküle durch eine zweite Modifikationssubstanz erhöht wird.
22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der zweiten Modifikationssubstanz um ein Alkylierungsreagenz, vorzugsweise um 3-(Acrylamidopropyl)-trimethylammoniumchlorid, handelt.

- 48 -

23. Verfahren zur Ermittlung von qualitativen Informationen über Proteine und/oder Peptide in Proben, insbesondere in biologischen Proben mit Zellen und/oder Zellsystemen, insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Proteine und/oder Peptide mit zwei oder mehr stabilen isoto-
markierten Aminosäuren markiert werden, umfassend die Verfahrensschritte:
- Behandeln mindestens einer Probe mit mindestens einem Beeinflussungsmittel vor und/oder nach der Markierung der Proteine und/oder Peptide in der Probe,
 - Ernten der Zellen und/oder Zellsysteme,
 - Messung von einem oder mehreren Proteinen und/oder Peptiden durch Massenspektrometrie,
 - Ermitteln der verschiedenen Isotopomeren-Verteilungen (RIA) für ausgewählte oder alle gemessenen Proteine und/oder Peptide einer Probe,
 - Analyse der Isotopomeren-Verteilungen zur Errechnung der qualitativen Informationen.
24. Verfahren zur Ermittlung von qualitativen Informationen über Proteine und/oder Peptide in mindestens zwei Proben, insbesondere biologischen Proben mit Zellen und/oder Zellsystemen, insbesondere nach einem Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Proteine und/oder Peptide mit mindestens einer stabilen isoto-
markierten Aminosäure markiert werden, umfassend die Verfahrensschritte:
- Behandeln jeder Probe mit mindestens einem Beeinflussungsmittel vor und/oder nach der Markierung der Proteine und/oder Peptide in der Probe,
 - Ernten der Zellen und/oder Zellsysteme,

- Messung von mindestens zwei, insbesondere mindestens vier, vorzugsweise mindestens sechs Peptiden und/oder Proteinen von jeder Probe durch Massenspektrometrie,
 - Ermittlung der verschiedenen Isotopomeren-Verteilungen (RIA) für ausgewählte oder alle gemessenen Proteine und/oder Peptide in einer ersten und mindestens einer zweiten Probe,
 - Analyse der Isotopomeren-Verteilungen zur Errechnung der qualitativen Informationen.
- 10
25. Verfahren zur Bestimmung des Verhältnisses der Proteinhäufigkeiten gleichartiger Proteine in einer ersten und mindestens einer zweiten Probe, insbesondere biologischen Probe mit Zellen und/oder Zellsystemen, wobei mindestens eine Probe mit mindestens einer stabilen Isotop-markierten Aminosäure markiert wird, umfassend die Verfahrensschritte:
- 15
- Behandeln jeder Probe mit mindestens einem Beeinflussungsmittel vor und/oder nach der Markierung der Proteine und/oder Peptide in der Probe,
 - 20 - Ernte der Zellen und/oder Zellsysteme,
 - Mischung von Aliquots der Proben mit jeweils gleichem Proteingehalt,
 - Messung von mindestens zwei, insbesondere mindestens vier, vorzugsweise mindestens sechs Proteinen der einzelnen Proben und der Mischungen der Proben durch Massenspektrometrie,
 - 25 - Ermittlung der verschiedenen Isotopomeren-Verteilungen für ausgewählte oder alle gemessenen Proteine in einer ersten und mindestens einer zweiten Probe,
 - 30 - Analyse der Isotopomeren-Verteilungen zur Errechnung des Verhältnisses der Proteinhäufigkeiten in jeder Probe unter Verwendung der Isotopomeren-Verteilungen der Proteine

- 50 -

aus den mindestens zwei Proben und der Mischung der Proben.

26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Markierung ein Gemisch von zwei oder mehr verschiedenen markierten Aminosäuren, insbesondere unterschiedlich markierten Aminosäuren, eingesetzt wird.
27. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Markierung eine stabile Isotopenquelle, die keine Aminosäure ist, eingesetzt wird, insbesondere ^{13}C -markierter Zucker und/oder ^{15}N -Atmosphäre.
28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide und/oder Proteine nach der Markierung und vor der massenspektrometrischen Messung ein- oder mehrfach fragmentiert werden.
29. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide und/oder Proteine in einem oder mehreren Trennungsschritten nach der Behandlung mit einem Beeinflussungsmittel und vor der massenspektrometrischen Messung aufgetrennt werden.
30. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß MALDI-Ionisierung und/oder Electrospray-Ionisierung für die massenspektrometrische Analyse mit zwei oder mehr Quadrupolen, „time of flight“, „iontrap“ und/oder „ioncyclotron“ für die Ionentrennung kombiniert wird.

1/4

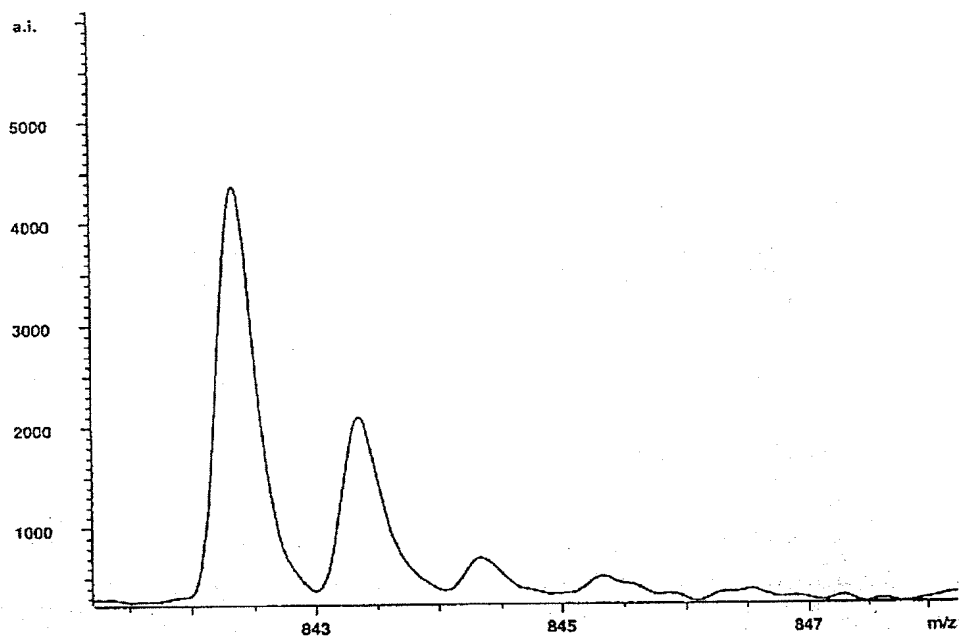


Abb. 1

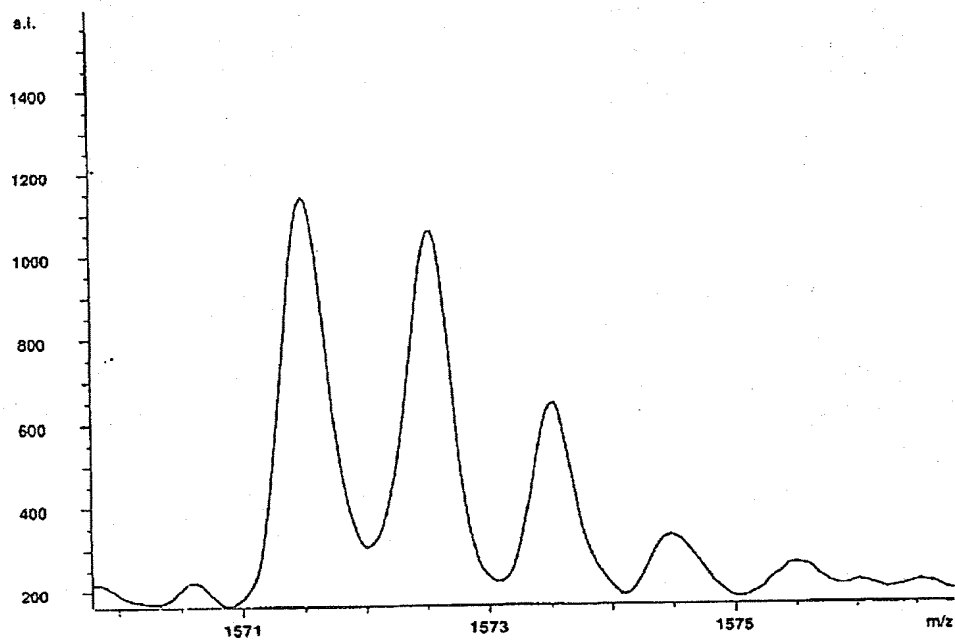


Abb. 2

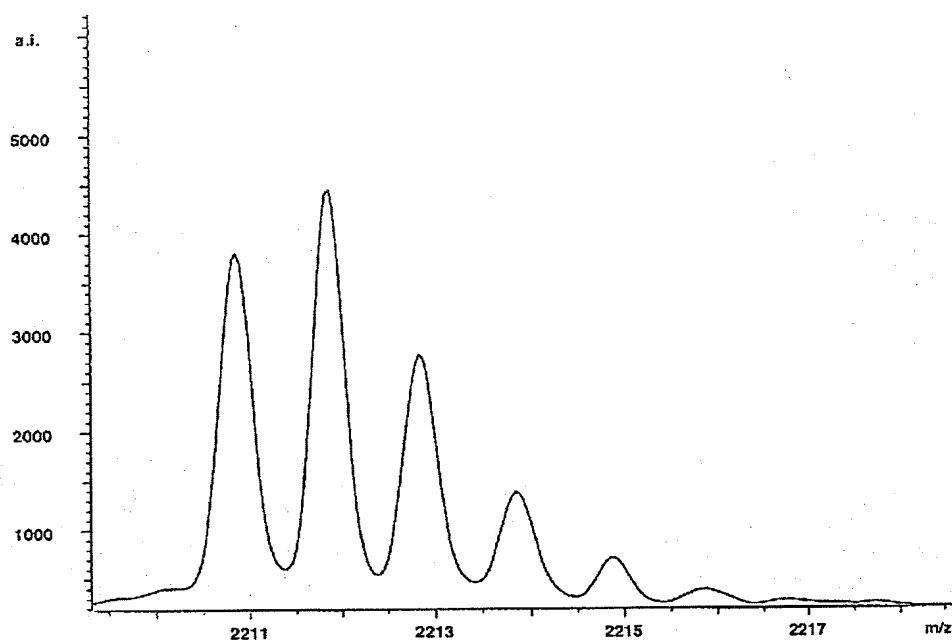


Abb. 3

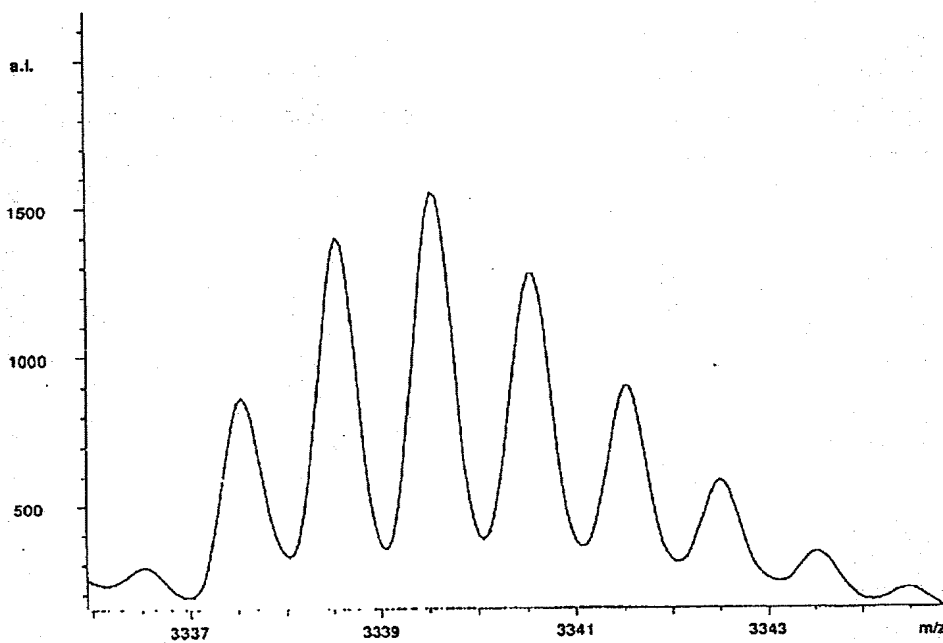


Abb. 4

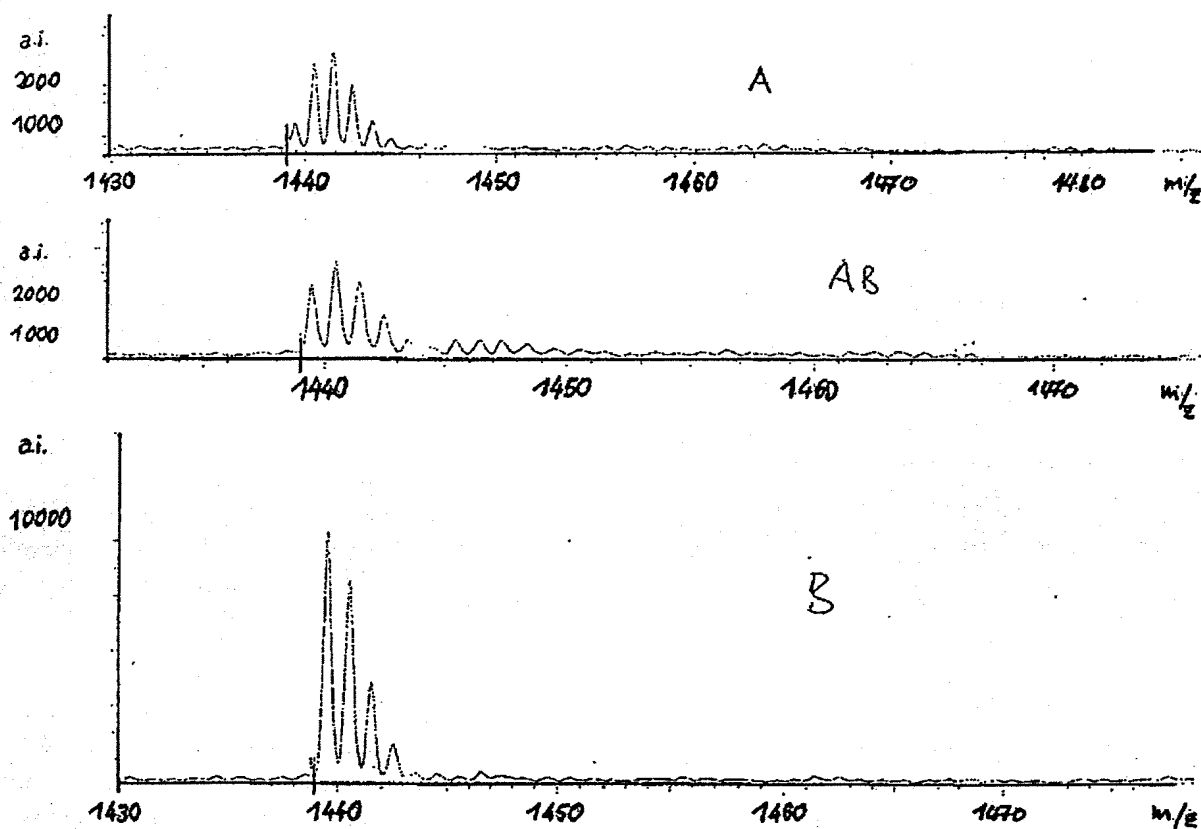


Abb. 5

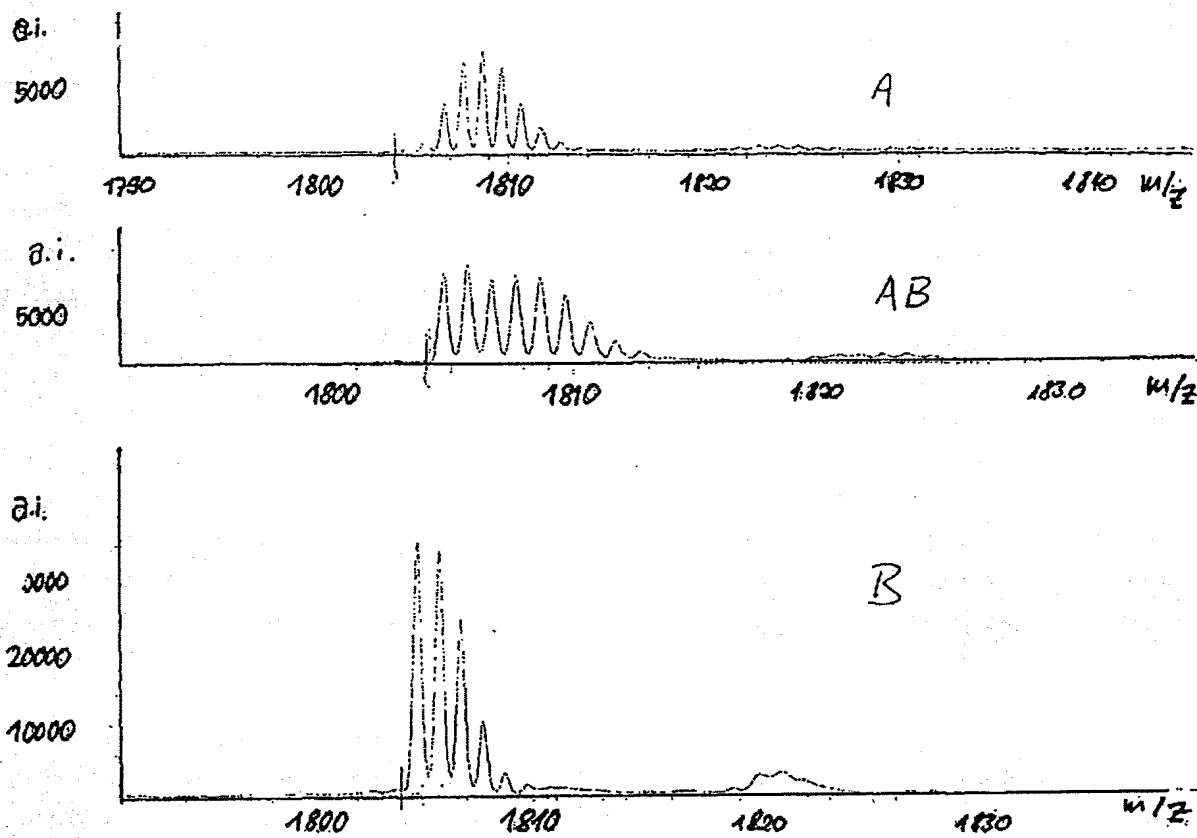


Abb. 6